

10 / 594952

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006110

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-100964
Filing date: 30 March 2004 (30.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 0 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 0 9 6 4

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

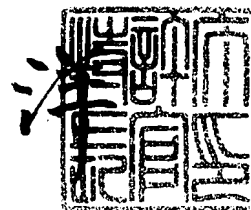
J P 2 0 0 4 - 1 0 0 9 6 4

出 願 人
Applicant(s): 浜松ホトニクス株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 2004-0018
【提出日】 平成16年 3月30日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 21/64
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社
 内
 【氏名】 片岡 卓治
【特許出願人】
 【識別番号】 000236436
 【氏名又は名称】 浜松ホトニクス株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100088155
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 長谷川 芳樹
【選任した代理人】
 【識別番号】 100092657
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 寺崎 史朗
【選任した代理人】
 【識別番号】 100124291
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 石田 悟
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 014708
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 ！
 【物件名】 明細書 ！
 【物件名】 図面 ！
 【物件名】 要約書 ！

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

容器内の液中における測定対象物の蛍光状態を容器の底部から測定する際に用いられるマスキング部材であって、

前記マスキング部材は、測定対象物上部の液から容器の底部への背景光を遮光する遮光部と、該遮光部を支持して測定対象物上部に位置決めする外枠部とを備え、

前記遮光部は、遮光性および液体透過性を有することを特徴とするマスキング部材。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のマスキング部材であって、

測定対象物を収容する複数のウェルを備えるマイクロプレートに適用されるものであり、前記複数のウェルに対応した複数の遮光部を備え、

前記外枠部は、前記マイクロプレートの上面を覆うシート状部を有し、各ウェル内に各遮光部をそれぞれ位置決めするようにされていることを特徴とするマスキング部材。

【請求項 3】

測定対象物を容器内に入れる第 1 ステップと、

前記容器内に蛍光色素を含む液を加える第 2 ステップと、

前記液を除去することなく、遮光性および液体透過性を有するマスキング部材を容器内の測定対象物上部に配置して、測定対象物上部の液から容器の底部への背景光を遮光する第 3 ステップと、

前記測定対象物の蛍光状態を容器の底部から測定する第 4 ステップと、
を備えたことを特徴とする蛍光測定方法。

【請求項 4】

測定対象物を容器内に入れる第 1 ステップと、

遮光性および液体透過性を有するマスキング部材を前記容器内の測定対象物上部に配置する第 2 ステップと、

前記容器内に蛍光色素を含む液を加える第 3 ステップと、

前記液を除去することなく、前記マスキング部材により測定対象物上部の液から容器の底部への背景光を遮光しつつ、測定対象物の蛍光状態を容器の底部から測定する第 4 ステップと、
を備えたことを特徴とする蛍光測定方法。

【請求項 5】

容器内の液中における測定対象物の蛍光状態を容器の底部から測定するための蛍光測定用キットであって、

測定対象物を収容した容器、および 1 以上のマスキング部材を備え、

前記マスキング部材は、測定対象物上部の液から容器の底部への背景光を遮光する遮光部と、該遮光部を支持して測定対象物上部に位置決めする外枠部とを有し、

前記遮光部は遮光性および液体透過性を有することを特徴とする蛍光測定用キット。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の蛍光測定用キットであって、前記容器は測定対象物を収容した 1 以上のウェルを有するマイクロプレートであり、

前記マスキング部材の外枠部は、遮光部を前記マイクロプレートのウェル内に位置決めするようにされていることを特徴とする蛍光測定用キット。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の蛍光測定用キットであって、1 つのマスキング部材を備え、

前記 1 つのマスキング部材は、前記マイクロプレートの複数のウェルに対応した複数の遮光部を有し、

前記 1 つのマスキング部材の外枠部は、前記マイクロプレートの上面を覆うシート状部を有し、各ウェル内に各遮光部をそれぞれ位置決めするようにされていることを特徴とする蛍光測定用キット。

【請求項 8】

液と測定対象物を内部に収容し、底部から測定対象物の蛍光状態を測定するための蛍光測定用容器であって、

前記蛍光測定用容器は、測定対象物上部の液から容器の底部への背景光を遮光するための遮光性および液体透過性を有するマスキング部材を容器内に配置されて使用されるものであり、

容器内壁に前記マスキング部材の位置決めをするための位置決め手段が設けられていることを特徴とする蛍光測定用容器。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の蛍光測定用容器であって、測定対象物を収容するための複数のウェルを備え、前記ウェル内壁には前記マスキング部材の位置決めをするための位置決め手段がそれぞれ設けられていることを特徴とする蛍光測定用容器。

【書類名】明細書

【発明の名称】マスキング部材、蛍光測定方法、蛍光測定用キットおよび蛍光測定用容器

【技術分野】

【0001】

本発明は、マスキング部材、蛍光測定方法、蛍光測定用キットおよび蛍光測定用容器に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、創薬における化合物ライブラリーのスクリーニングのため、蛍光測定が用いられる。このような蛍光測定では、まずシャーレ、バイエル瓶等の透明容器の底部に、細胞等の測定対象物を培養して配置する。そして、蛍光色素を含むバッファー（緩衝液、外液）を追加注入する。このままでは、細胞等に吸収されなかった蛍光色素の蛍光が背景光となり、測定対象物からの蛍光を容器底部から識別して測定することが困難となるため、このような過剰の蛍光色素を含むバッファーを吸引除去し、蛍光色素を含まないバッファーを追加することを繰り返す洗浄（バッファー置換、ウォッシュアウト）が行われる。その後、スクリーニングを行いたい化合物（試薬）等を投入し、容器の底部から測定対象物の蛍光状態を測定することにより、スクリーニングを行うことができる。

【0003】

これらの蛍光測定では、スクリーニングを行いたい化合物には自家蛍光を持つものが多い。自家蛍光を持つ化合物は、これらの化合物の7～8割に達するとの予測がある。ここで、自家蛍光を有する化合物を分注して試験する場合、計測される蛍光値が細胞等の測定対象物に由来するものなのか、バッファー中の化合物に由来するもの（アーチファクト）なのか判断することが困難である。その結果、擬陽性が増大するという問題が生じている。特に、高スループットな化合物のスクリーニングにおいては、検出精度低下、さらにはスループット低下の原因となる。

【0004】

このような化合物の自家蛍光の問題を解決するため、例えば、黒色色素あるいは様々な種類の色素をバッファー中に混ぜて化合物の自家蛍光による影響を落とす方法が実用化されている（例えば、特許文献1の図2参照）。あるいは、ポリマーラテックスビーズ、無機粒子等をバッファー中に添加し、測定対象物上に供して積層させて光学的な分離層を形成することにより、測定対象物を上から覆い、それにより分離層より上のバッファー由来の背景蛍光を遮光する方法も提案されている（例えば、特許文献1の図6参照）。

【特許文献1】特許第3452068号明細書（図2、図6）。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、前述したような黒色色素等をバッファー中に混ぜる方法では、この黒色色素等自体が、測定対象物である細胞の機能に影響を及ぼし、各種反応の阻害を引き起こすケースがあり、全ての測定系に対応できない問題がある。また、色素での消光の場合、波長ごとに吸収帯域が異なるため、蛍光色素の種類や測定系により最適な色素の選択が必要となる問題もある。

【0006】

一方、前述のポリマーラテックスビーズ等をバッファー中に添加し、測定対象物上に供して積層させて光学的な分離層を形成する方法では、ポリマーラテックスビーズ等の粒子が測定対象物である細胞に直接接触することにより、細胞への悪影響が生じる問題がある（物理的接触による影響）。また、ポリマーラテックスビーズ等により分離層が形成された後に、さらに試薬を分注すると、ピペットの吐出圧等によって分離層にクレーターが生じて分離層が乱れ、分離層の厚さが一様でなくなる。その場合、分離層に層の薄い箇所と厚い箇所が生じ、その結果、細胞等に由来する蛍光の高分解能な検出ができなくなるという問題もある。

【0007】

さらに前述したような従来の方法では、測定対象物に蛍光色素を加えた後に、過剰の蛍光色素を含むバッファーを吸引除去して、蛍光色素を含まないバッファーを追加置換する洗浄が必要となるが、このような洗浄は手間がかかりスループット低下の原因となる。また、洗浄により、細胞等の測定対象物が容器の底から剥離してしまう欠点がある。

【0008】

本発明は、斯かる実情に鑑み、前述したようなバッファー中の化合物由来の蛍光による影響を、測定対象物に悪影響を与えることなく確実に除去し、さらにバッファーの蛍光色素の洗浄を不要とする、蛍光測定用のマスキング部材、蛍光測定方法、蛍光測定用キットおよび蛍光測定用容器を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、容器内の液中における測定対象物の蛍光状態を容器の底部から測定する際に用いられるマスキング部材であって、マスキング部材は、測定対象物上部の液から容器の底部への背景光を遮光する遮光部と、その遮光部を支持して測定対象物上部に位置決めする外枠部とを備え、遮光部は、遮光性および液体透過性を有することを特徴とする。

【0010】

上記の構成によれば、マスキング部材は、測定対象物上部の蛍光色素等を含む液から容器底部への背景光を遮光して、測定対象物からの蛍光と分離することができる。一方、マスキング部材は、液体を透過させ、液中の蛍光色素や化合物等を測定対象物と反応させることができる。外枠部によりマスキング部材は、容器内の測定対象物上部の所定の位置に配置される。

【0011】

これにより、マスキング部材自体は細胞等の測定対象物に接触することなく、測定対象物以外の化合物由来の蛍光を確実に遮光できるため、細胞等の測定対象物に悪影響を与えることなく、化合物の自家蛍光の影響を排除した高感度な蛍光測定が可能となる。この場合、蛍光色素の種類（蛍光波長）や測定系を選ばず、どのような測定にも対応可能である。また、マスキング部材挿入後に試薬を分注した場合は、マスキング部材は液体透過性を有するため、試薬はマスキング部材を透過して測定対象物に到達し、マスキング部材自体の遮光性は均一に保たれ、蛍光の高分解能の検出が可能である。

また、蛍光色素を加える前または加えた後に、容器内にマスキング部材を挿入するだけで、バッファー中の過剰な蛍光色素からの蛍光も遮光することができるため、前述のバッファーの蛍光色素の洗浄が不要となり、スループットの向上を図ることができる。

【0012】

この場合、上記マスキング部材は、測定対象物を収容する複数のウェルを備えるマイクロプレートに適用されるものであり、その複数のウェルに対応した複数の遮光部を備え、その外枠部は、上記マイクロプレートの上面を覆うシート状部を有し、各ウェル内に各遮光部をそれぞれ位置決めするようにされているものとすることができる。

【0013】

上記の構成によれば、マイクロプレートの複数のウェルに測定対象物を入れて、同時に多数の蛍光測定を行う場合においても、一括して各ウェルの遮光を行うことができ、蛍光測定のスループットをさらに向上させることができる。

【0014】

また本発明は、測定対象物を容器内に入れる第1ステップと、容器内に蛍光色素を含む液を加える第2ステップと、液を除去することなく、遮光性および液体透過性を有するマスキング部材を容器内の測定対象物上部に配置して、測定対象物上部の液から容器の底部への背景光を遮光する第3ステップと、測定対象物の蛍光状態を容器の底部から測定する第4ステップと、を備えたことを特徴とする。あるいは、測定対象物を容器内に入れる第1ステップと、遮光性および液体透過性を有するマスキング部材を容器内の測定対象物上部に配置する第2ステップと、容器内に蛍光色素を含む液を加える第3ステップと、液を

除去することなく、マス킹部材により測定対象物上部の液から容器の底部への背景光を遮光しつつ、測定対象物の蛍光状態を容器の底部から測定する第4ステップと、を備えたことを特徴とする。

【0015】

上記の構成によれば、マス킹部材により測定対象物上部の液から容器底部への背景光を遮光して、測定対象物からの蛍光と分離することができる。また、液中の蛍光色素等の成分は、マス킹部材を透過させて測定対象物と反応させることができる。

これにより、測定対象物に悪影響を与えることなく、バッファー中における化合物の自家蛍光の影響を排除した高感度な蛍光測定が可能となる。また、蛍光色素の種類等にかかわらず種々の測定に対応可能である。さらに、マス킹部材配置後に試薬を分注した場合でも、遮光の均一性は保たれる。そして、蛍光色素を加える前あるいは加えた後に、マス킹部材を容器内に挿入するだけでバッファー中の過剰な蛍光色素からの蛍光を遮光できるので、バッファーの蛍光色素の洗浄が不要となり、スループットの向上を図ることができる。

【0016】

また本発明は、容器内の液中における測定対象物の蛍光状態を容器の底部から測定するための蛍光測定用キットであって、測定対象物を収容した容器、および1以上のマス킹部材を備え、マス킹部材は、測定対象物上部の液から容器の底部への背景光を遮光する遮光部と、その遮光部を支持して測定対象物上部に位置決めする外枠部とを有し、遮光部は遮光性および液体透過性を有することを特徴とする。

【0017】

上記の構成によれば、マス킹部材は、測定対象物上部の蛍光色素等を含む液から容器底部への背景光を遮光して、測定対象物からの蛍光と分離することができる。一方、マス킹部材は、液体を透過させ、液中の蛍光色素や化合物等を測定対象物と反応させることができる。

これにより、当該測定用キットを用いるだけで、測定対象物に影響を与えることなく高感度な蛍光測定を手軽に行うことができる。適用する蛍光色素および測定装置等は種々の物を選択することができ、試薬の分注時にも高精度の測定が可能である。また、バッファーの蛍光色素の洗浄も不要であり、高スループットの測定が可能となる。

【0018】

この場合、上記蛍光測定用キットであって、上記容器は測定対象物を収容した1以上のウェルを有するマイクロプレートであり、上記マス킹部材の外枠部は、遮光部をマイクロプレートのウェル内に位置決めするようにされているものとできる。

【0019】

上記の構成によれば、マイクロプレートの複数のウェル内に種々の測定対象物が収容されており、ウェルの内の一部あるいは全部にマス킹部材をそれぞれ挿入することにより、当該ウェル内を遮光することができ、種々の蛍光測定を効率良く行うことができる。

【0020】

この場合、上記蛍光測定用キットであって、1つのマス킹部材を備え、1つのマス킹部材は、マイクロプレートの複数のウェルに対応した複数の遮光部を有し、1つのマス킹部材の外枠部は、マイクロプレートの上面を覆うシート状部を有し、各ウェル内に各遮光部をそれぞれ位置決めするようにされているものとすることができる。

【0021】

上記の構成によれば、マイクロプレートの複数のウェルに一括してマス킹部材を挿入して、各ウェルを遮光することができるため、マイクロプレートの多数のウェルを用いた蛍光測定をさらに高い効率で行うことができる。

【0022】

また本発明は、液と測定対象物を内部に収容し、底部から測定対象物の蛍光状態を測定するための蛍光測定用容器であって、蛍光測定用容器は、測定対象物上部の液から容器の底部への背景光を遮光するための遮光性および液体透過性を有するマス킹部材を容器

内に配置されて使用されるものであり、容器内壁に前記マスキング部材の位置決めをするための位置決め手段が設けられていることを特徴とする。

【0023】

上記の構成によれば、マスキング部材は位置決め手段により、測定対象物上部の所定の位置に配置される。配置されたマスキング部材は、測定対象物上部の蛍光色素等を含む液から容器底部への背景光を遮光して、測定対象物からの蛍光と分離することができる。

これにより、この蛍光測定用容器にマスキング部材を挿入して遮光するだけで、測定対象物に影響を与えることなく高感度な蛍光測定が可能となる。適用する蛍光色素および測定装置等は種々の物を選択することができ、試薬の分注時にも高精度の測定が可能である。また、バッファの蛍光色素の洗浄も不要であり、高スループットの測定が可能となる。さらに、マスキング部材自体に容器内での位置決めをする手段が特に設けられていなくても、測定対象物に接触せずに十分な遮光ができる位置にマスキング部材を配置することができる。

【0024】

この場合、上記蛍光測定用容器であって、測定対象物を収容するための複数のウェルを備え、このウェル内壁にはマスキング部材の位置決めをするための位置決め手段がそれぞれ設けられているものとすることができる。

【0025】

上記手段のようなマイクロプレート型の蛍光測定用容器であれば、その複数のウェルに種々の測定対象物を入れて、同時に複数種類の蛍光測定が可能となる。各ウェル内壁にはそれぞれマスキング部材の位置決め手段が設けられているため、それぞれマスキング部材を挿入して遮光を行うことにより、バッファ中における化合物の自家蛍光の影響を排除した高感度な蛍光測定が可能となる。

【発明の効果】

【0026】

本発明のマスキング部材、蛍光測定方法、蛍光測定用キットおよび蛍光測定用容器によれば、細胞等の測定対象物に悪影響を与えることなく、バッファ中における化合物の自家蛍光の影響を排除した高感度な蛍光測定が可能となる。また、蛍光色素の種類（蛍光波長）や測定系を選ばず、どのような測定にも対応可能である。また、マスキング部材挿入後に試薬を分注した場合も、マスキング部材の遮光性は均一に保たれ、蛍光の高分解能の検出が可能である。さらに、バッファの蛍光色素の洗浄が不要となり、スループットの向上を図ることができる、という優れた効果を奏し得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

以下、本発明の実施の形態を添付図面を参照して説明する。

図1(a)は本発明の第1実施形態に係るマスキング部材の斜視図であり、図1(b)はその縦断面図である。

図1(a)(b)に示すように、本実施形態のマスキング部材100は、遮光部1と、遮光部1を支持して容器内に位置決めする外枠部10を備える。外枠部10は、図1(a)に示すように、容器内壁に嵌合するような円筒形状とされている。外枠部10はリム状部11を有し、使用時には容器上部に係合して遮光部1を容器内の所定の深さに位置させるようになっている。外枠部10は、測定時にタンパク質の非特異的吸着を抑制する観点から、疎水性・非吸収性を有することが好ましく、材質としてはポリスチレンやポリプロピレン、ポリエチレンが好ましい。また、遮光および消光をするため、一般的にマスキング部材100は黒色とすることが好ましい。

【0028】

図1(a)(b)に示すように、外枠部10に支持される遮光部1は膜形状とされている。この遮光部1は、遮光性および液体透過性を有する。図2～図4は、遮光部の具体的な構造例をそれぞれ示したものである。

【0029】

図2(a)は単層メッシュ構造の遮光部を有するマスキング部材を示す斜視図であり、図2(b)は縦断面図であり、図2(c)は遮光部の拡大図である。

図2(a)～(c)に示した例では、マスキング部材100は単層メッシュ構造の遮光部1aを備える。図2(a)(b)に示すように、遮光部1aはメッシュ状の網目構造を有する。図2(c)に示すように、遮光部1aを構成するメッシュ2は複数の微小なメッシュ穴3を有し、蛍光測定時にはメッシュ穴3を通してバッファー等の液が透過できるようになっている。一方、メッシュ穴3は微小なため、遮光部1aに入射した光の大部分を透過させず、遮光できるようになっている。

【0030】

図3(a)は2層メッシュ構造の遮光部を有するマスキング部材を示す斜視図であり、図3(b)は縦断面図であり、図3(c)は遮光部の拡大図である。

図3(a)～(c)に示した例では、マスキング部材100は2層メッシュ構造の遮光部1bを備える。図3(a)に示すように、遮光部1bは単層メッシュを2枚重ねた構造を有する。図3(b)に示すように、この2層メッシュ構造は、2層のメッシュの網目が互い違いになるように配置されている。図3(c)にさらに詳細に示すように、遮光部1bは、メッシュ2、2'のメッシュ穴3、3'がそれぞれ互い違いに重なり、遮光部1bに入射した直射光はほとんど透過できないようにされている。したがって、図2のような単層メッシュ構造にくらべて、より高い遮光性を有するものとなる。一方、バッファー等の液体は2層のメッシュ2、2'におけるそれぞれのメッシュ穴3、3'を透過できるようにされている。

【0031】

図4(a)は斜筒構造の遮光部を有するマスキング部材を示す斜視図であり、図4(b)は縦断面図であり、図4(c)は遮光部の拡大図である。

図4(a)～(c)に示した例では、マスキング部材100は斜筒構造の遮光部1cを備える。図4(a)に示すように、遮光部1cにはその表裏を貫通する穴が複数設けられている。しかし、図4(b)(c)に示すように、この穴は遮光部1cに垂直に設けられておらず、斜めに角度を付けて設けられた斜め穴4となっている。このため、遮光部1cに入射した光はほとんど透過することができず、遮光されるようになっている。一方、バッファー等の液体は遮光部1cの斜め穴4を透過することができるようになっている。

【0032】

以上のような遮光部は、外枠部と同様に疎水性・非吸収性を有することが好ましい。具体的な材質としては、ナイロン、ポリエステル、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネイト、セルロース、木綿、ウール、シリコン、ガラス等が挙げられる。

【0033】

次に図5を参照して、本実施形態のマスキング部材の機能について説明する。図5は、本発明の第1実施形態に係るマスキング部材の使用状態を示す縦断面図である。図5に示すように、底部が透明な容器400の底部には、培養された細胞やコーティングされた抗体等の測定対象物Sが配置される。容器400には、蛍光色素を含む液(バッファー)Bが入れられ、測定対象物SはバッファーB中の蛍光色素によって所定の蛍光を発するようにされている。バッファーB中には、スクリーニングを行いたい化合物(試薬)も投入される。容器400には、本実施形態に係るマスキング部材100が挿入されている。マスキング部材100の外枠部10のリム状部11は、容器400の上端に係合し、遮光部1を容器400内の所定の位置に位置決めする。遮光部1は、測定対象物Sに物理的な影響を与えない観点から、測定対象物Sに接触しない高さに位置決めすることが好ましい。

【0034】

この状態では、測定対象物Sからの蛍光Lは、容器400の透明な底部から蛍光測定されることができる。一方、バッファーB中に存在する化合物の自家蛍光によるバッファーBからの背景光1は、遮光部1により遮光される。そのため、容器400の底部からの蛍

光測定において、バッファーからの背景光1に邪魔されることがなく、測定対象物からの蛍光Lのみを測定することができ、擬陽性の少ない高精度な蛍光測定が可能となる。

【0035】

さらにこの場合、バッファーB中の測定対象物Sに吸収されなかった過剰な蛍光色素からの蛍光も遮光部1により遮光される。そのため、従来、必要であったバッファーの蛍光色素の洗浄は不要となる。その結果、洗浄の手間を省き、前述した洗浄により測定対象物が容器底部から剥離する問題も生じないため、スループットの向上を図ることができる。また、このマスキング部材100を付けたままの状態を試薬等を分注することができ、分注された試薬は、液体透過性を有する遮光部1を介して、測定対象物Sに到達して所定の反応を起こし、その結果を蛍光観察することが可能となる。

【0036】

この図5の例では、測定対象物Sは容器400の底部に固定されているが、本発明のマスキング部材は、バッファーB中に浮遊する細胞等の蛍光測定をする際にも適用することができる。この場合は、例えば、遮光部1のメッシュ穴のサイズをより微小なものとし、浮遊細胞を遮光部1より下に留めるようにすることが好ましい。

【0037】

図6(a)は本発明の第2実施形態に係るマスキング部材の全体斜視図であり、図6(b)は拡大図であり、図6(c)は遮光部周辺の拡大図であり、図6(d)は使用状態を示す縦断面図である。

この第2実施形態のマスキング部材が第1実施形態と異なる点は、複数のウェルを備えるマイクロプレートに使用されることにある。

【0038】

図6(a)～(c)に示すように、本実施形態のマスキング部材200は、測定対象物を収容する複数のウェルを備えるマイクロプレートに使用されるものであり、そのマイクロプレートの複数のウェルに対応した複数の遮光部1を備え、この遮光部1を支持する外枠部20もそれに対応した複数の小円筒形状をなしている。ここで外枠部20は、さらにマイクロプレートの上面を覆う一体構造のシート状部21を有し、マイクロプレートの上面形状と嵌合して、マイクロプレートの各ウェル内に各遮光部1をそれぞれ位置決めするようにされている。

【0039】

図6(b)(c)に示すように、個々の遮光部1と、それを支持する小円筒形状の外枠部20は、前記第1実施形態のマスキング部材と同様の構造と材質を適用することができる。なお、全ウェル同時測定する系で使用するため、全ウェルの遮光・消光条件を統一するために、各遮光部1の構造と各ウェル中での位置関係を均一にする事が好ましい。

【0040】

本実施形態のマスキング部材の使用状態においては、図6(d)に示すように、マイクロプレート500に設けられたウェル550の透明な底部には、培養された細胞等の測定対象物Sが配置される。各ウェル550内には、蛍光色素を含む液(バッファー)Bが投入され、各ウェル中の測定対象物Sは所定の蛍光を発するようにされている。バッファーB中には、各ウェル毎にスクリーニングを行いたい化合物(試薬)も投入される。マイクロプレート500には本実施形態に係るマスキング部材200が、各遮光部1とそれを支持する小円筒状の外枠部20が各ウェル550と嵌合するように挿入される。一体構造のシート状部21がマイクロプレート500の上面を覆うようにして嵌合することにより、遮光部1はウェル550内の所定の位置に位置決めされる。

【0041】

本実施形態に係るマスキング部材では、第1実施形態と同様に、各ウェル中の測定対象物Sからの蛍光Lは、ウェル550の透明な底部から蛍光測定されることができる。一方、遮光部1より上部のバッファーBからの背景光1は、遮光部1により遮光される。そのため、各ウェル550の底部からの蛍光測定において、バッファーからの背景光1に邪魔されることがなく、高精度な蛍光測定が可能となる。

【0042】

本実施態様においても、バッファーB中の過剰な蛍光色素からの蛍光は、遮光部1により遮光されるため、バッファーの蛍光色素の洗浄は不要であり、スループットの向上を図ることができる。マスキング部材200を付けたままの状態、各ウェル550中にそれぞれ所望の試薬等を分注することができ、分注された試薬は、液体透過性を有する遮光部1を介して、測定対象物Sに到達して所定の反応を起こし、その結果を各ウェル550の底部から蛍光観察することができる。これにより全ウェル同時に種々の蛍光測定を行なうことが可能である。

【0043】

次に、上記第2実施形態に係るマスキング部材を使用した場合を例にとり、本発明に係る蛍光測定方法を具体的に説明する。

図7(a)～(d)は、本発明の第2実施形態に係るマスキング部材を用いた蛍光測定方法を示した説明図である。この方法では、まず第1ステップとして、マイクロプレート500のような容器の各ウェル550の透明な底部に、培養した細胞またはコーティングされた抗体等の形で測定対象物Sを入れる(図7(a))。次に第2ステップとして、各ウェル550内に、蛍光色素を含んだ液(バッファー)Bを加える(図7(b))。そして第3ステップとして、蛍光色素を含んだバッファーBを除去することなく(洗浄を行うことなく)、前述したような遮光性および液体透過性を有するマスキング部材200をマイクロプレート500に挿入・嵌合して、測定対象物Sの上部に配置する(図7(c))。これにより、ウェル550内に存在する測定対象物S以外からの蛍光が遮光される。

【0044】

このようにマスキング部材200により、バッファーB中の過剰な蛍光色素からの蛍光を遮光するため、手間がかかるバッファーの蛍光色素の洗浄を行う必要がない。また、洗浄によりウェル550底部から細胞等の測定対象物が剥離するような問題も生じない。そのため、高スループットの蛍光測定が可能となる。

【0045】

その後、第4ステップとして、バッファーBからの背景光1が遮光部1により遮光された状態で、測定対象物Sからの蛍光Lを各ウェル550の底部から蛍光観察する(図7(d))。なお、スクリーニングを行いたい化合物や試薬等は、マスキング部材200を挿入する前に測定対象物Sに供給することができる。また、マスキング部材200を挿入した後は、液体透過性を有する遮光部1を介して測定対象物Sに供給することができる。この方法においては、バッファーBからの背景光1を遮光することができるため、高精度の蛍光測定が可能となる。

【0046】

図8(a)～(d)は、本発明の第2実施形態に係るマスキング部材を用いた別の蛍光測定方法を示す説明図である。この方法では、第1ステップとして、図7に示す方法と同様に測定対象物Sをマイクロプレート500の各ウェル550に入れる(図8(a))。しかし、第2ステップとして、先にマスキング部材200をマイクロプレート500に挿入・嵌合して、測定対象物Sの上部に配置する(図8(b))。そして第3ステップとして、各ウェル550中に蛍光色素を含む液(バッファー)Bを加える(図8(c))。その後、第4ステップとして、蛍光色素を含んだバッファーBを除去することなく(洗浄を行うことなく)、バッファーBからの背景光1が遮光部1により遮光された状態で、測定対象物Sからの蛍光Lを各ウェル550の底部から蛍光観察する(図8(d))。スクリーニングを行いたい試薬等は、図7の方法と同様に適宜測定対象物Sに供給することができる。

【0047】

このように、測定対象物に蛍光色素を供給する前にマスキング部材を挿入する方法でも、バッファーの蛍光色素の洗浄を行うことなく、バッファー中の背景蛍光を遮光して、高精度、高スループットの蛍光測定を行うことができる。

【0048】

図9（a）は本発明の第3実施形態に係る蛍光測定用キットを示し、図9（b）は第4実施形態に係る蛍光測定用キットを示し、図9（c）は第5実施形態に係る蛍光測定用キットを示す。これらの第3～第5実施形態に係る蛍光測定用キットでは、測定対象物は予め容器内に収容されており、この容器と遮光を行うためのマスキング部材が1セットとなり、手軽に高精度の蛍光測定が行えるようにされている。

【0049】

図9（a）に示すように、第3実施形態の蛍光測定用キット800は、測定対象物Sとして予め底部に抗体がコーティング済みのシャーレまたはバイエル瓶型の容器400と、容器400内に存在する測定対象物S以外の物からの光を遮光するために容器400内に挿入されるマスキング部材100を1セットとして備える。マスキング部材100は、前述の第1実施形態に係るマスキング部材と同様に、遮光部1と、その遮光部1を支持して容器400内に位置決めする外枠部10を有する。遮光部1は遮光性および液体透過性を有し、前述の図2～4に示すような構造を有する。外枠部10は、容器400上部に係合して容器400内に遮光部1を位置決めするリム状部11を有する。これらは、蛍光色素を含むバッファー等の液およびスクリーニングを行いたい試薬等を、容器400にマスキング部材100を付けたままの状態で投入することにより、簡単に前述の図5に示したような状態で蛍光測定を行うことができる。

【0050】

図9（b）に示すように、第4実施形態の蛍光測定用キット810は、容器として予め測定対象物S（抗体）がコーティング済みの複数のウェル550を有するマイクロプレート500と、1以上のマスキング部材100とを1セットとして備えた点が第3実施形態と異なる。マイクロプレート500の各ウェル550には、同種あるいは異種の抗体等からなる測定対象物Sが予め入れられており、種々の測定・検査が行えるようにされている。個々のマスキング部材100の外枠部10は、遮光部1をマイクロプレート500のウェル550内に位置決めするためのリム状部11を含む。これらのマスキング部材100は、ウェル550の一部または全部にそれぞれ挿入され、蛍光色素を含むバッファー等の液およびスクリーニングを行いたい試薬等をそのウェル550内に投入することにより、各ウェル550で簡単に種々の蛍光測定が行えるようにされている。

【0051】

図9（c）に示すように、第5実施形態の蛍光測定用キット820は、容器として第4実施形態のようなマイクロプレート500を備えるが、マスキング部材として前述の第2実施形態の図6に示したような一体構造から成る1つのマスキング部材200を備えた点が第4実施形態と異なる。このマスキング部材200は、マイクロプレート500の複数のウェル550に対応した複数の遮光部1を有する。このマスキング部材200のシート状部21は、前述の図6に示したように、マイクロプレート500の上面を覆うシート状であり、各ウェル550内に各遮光部1を位置決めするようにされている。この例では、例えば、各ウェル550内に種々の抗体等の測定対象物Sをコーティングしておき、マスキング部材200を挿入・嵌合させたままで、蛍光色素を含むバッファー等の液およびスクリーニングを行いたい試薬等を、適宜、各ウェル550中に投入することにより、短時間で簡単に種々のスクリーニングを行うことができる。この第5実施形態では、マスキング部材200の挿入・嵌合は全てのウェル550に対して一括して一度に行うことができ、作業の省力化を図ることができる。

【0052】

次に、上記第5実施形態に係る蛍光測定用キットを使用した場合を例にとり、本発明に係る蛍光測定用キットの使用方を具体的に説明する。

図10（a）～（e）は、上記第5実施形態に係る蛍光測定用キットの使用方の一例を示す。この例の蛍光測定用キット820は、測定対象物Sとして抗体がマイクロプレート500の各ウェル550の底部にコーティングされている（図10（a））。これに対し、細胞が産出した物質や抗原等が含まれるサンプル溶液SSを各ウェル550内に規定量入れて反応させる（図10（b））。その後、サンプル溶液を除いて抗原洗浄を行う（

図10(c))。そして、蛍光色素を含む基質バッファーBをウェル550に加える(図10(d))。最後に、マスキング部材200を全てのウェル550に落とし込んで嵌合させ、バッファーBの蛍光色素の洗浄を行わずにウェル550の底面から蛍光測定する(図10(e))。このようにして、1つの蛍光測定用キットだけで、種々の蛍光測定を簡単に行うことができ、細胞を用いた蛍光アッセイの他、蛍光イノムアッセイのツールとしても用いることができる。

【0053】

なお、本実施形態に係る蛍光測定用キットは、上記図10の例のようにマスキング部材を着脱することなく、マイクロプレートにマスキング部材を嵌合・装着したまま、蛍光色素を含むバッファーや試薬を各ウェルに投入し、バッファーの蛍光色素の洗浄を行わずウェル底面から蛍光測定することによっても、種々の蛍光測定を行うことができる。

【0054】

図11(a)は本発明の第6実施形態に係る蛍光測定用容器を示す斜視図であり、(b)は縦断面図であり、(c)は使用状態を示す縦断面図である。前述の第1～第5実施形態では、マスキング部材を位置決めする手段がマスキング部材側に設けられていたのに対し、本実施形態では測定対象物を収容する容器の側に位置決め手段が設けられている点が異なっている。

【0055】

本実施形態の蛍光測定用容器は、容器内に存在する測定対象物以外の物からの光を遮光するための遮光性および液体透過性を有するマスキング部材を、容器内に挿入されて使用されるものである。図11(a)～(c)に示すように、この蛍光測定用容器600の内壁には、マスキング部材を位置決めするための位置決め手段630が設けられている。この例では、容器内壁に段差を設けることによりマスキング部材の位置決めをするようにされているが、位置決め手段としてはこれに限定されるものではなく、他の態様より容器内壁に凹凸部を設けて位置決めをしたり、パネ、ネジ、磁力等を利用した止め具等により位置決めするようにされていても良い。

【0056】

図11(c)に示すように、蛍光測定時には、位置決め手段630に、遮光性および液体透過性を有するマスキング部材100'が載置され、蛍光測定用容器600内の所定の位置に位置決めされる。これにより、前述の第1実施形態と同様にして、バッファーBからの背景光Iを遮光し、測定対象物Sからの蛍光Lを測定することができる。本実施形態では位置決め手段630が、蛍光測定用容器側に設けられているため、第1実施形態の図1に示したマスキング部材のように、マスキング部材側に位置決め手段は必要ない。そのため、例えば遮光性および液体透過性を有するメッシュ構造の膜材等をそのままマスキング部材として使用することができる。

【0057】

図12(a)は本発明の第7実施形態に係る蛍光測定用容器を示す全体斜視図であり、(b)は拡大図であり、(c)はウェル周辺の拡大図であり、(d)は使用状態を示す縦断面図である。本実施形態では、容器は測定対象物を収容するための複数のウェルを備えたマイクロプレート型である点が、第6実施形態とは異なる。

【0058】

図12(a)に示すように、本実施形態の蛍光測定用容器700は、通常のマイクロプレートと同様に測定対象物を収容するための複数のウェル750を備える。しかし図12(b)の拡大図および図12(c)のウェル750周辺の拡大図に示すように、本実施形態の蛍光測定用容器700は、各ウェル750内壁にマスキング部材を位置決めする位置決め手段730がそれぞれ設けられている。

【0059】

図12(d)に示すように、蛍光測定時には、各ウェル750内壁の位置決め手段730に、遮光性および液体透過性を有するマスキング部材100'が載置され、各ウェル750内の所定の位置に位置決めされる。これにより、第2実施形態のマスキング部材を用

いた場合と同様に、バッファBからの背景光1を遮光し、測定対象物Sの蛍光Lの測定を行うことができる。本実施形態においても位置決め手段は蛍光測定用容器側に設けられているため、マスキング部材側に第2実施形態の図6に示したような位置決め手段は必要なく、遮光性および液体透過性を有するメッシュ構造の膜材等をそのままマスキング部材として各ウェルに挿入して用いることができる。

【実施例】

【0060】

各ウェルの底面にCHO細胞を接着したマイクロプレートを用意した。次に、これらのマイクロプレートのCHO細胞に蛍光色素(Fluo3)を含むバッファを供給した。この際に蛍光色素を含むバッファを除去することはせず、蛍光色素の洗浄は行わなかった。さらに、両マイクロプレートの各ウェル内に1 μ MのFITCを加えた。

【0061】

次にこれらのマイクロプレートに対応した図6に示したようなマスキング部材を用意した。それぞれの遮光部の構造は図2に示すような単層メッシュ構造の物を用いた(ナイロン繊維製)。そして、このマスキング部材を挿入したマイクロプレートと、マスキング部材を挿入しないマイクロプレートについて、ウェルの底面から蛍光測定を行った。

【0062】

その結果、マスキング部材を挿入したマイクロプレートでは、細胞由来の蛍光の検出が可能であった。一方、マスキング部材を挿入していないマイクロプレートでは、1 μ MのFITCは非常に高い蛍光量のため、蛍光測定に用いたカメラレンジがすぐに飽和してしまい、細胞由来の蛍光の検出ができなかった。

【0063】

尚、本発明のマスキング部材、蛍光測定方法、蛍光測定用キットおよび蛍光測定用容器は、上記した実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲内において種々変更を加え得ることは勿論である。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】(a)は第1実施形態に係るマスキング部材を示す斜視図であり、(b)はその縦断面図である。

【図2】(a)は単層メッシュ構造の遮光部を有するマスキング部材を示す斜視図であり、(b)は縦断面図であり、(c)は遮光部の拡大図である。

【図3】(a)は2層メッシュ構造の遮光部を有するマスキング部材を示す斜視図であり、(b)は縦断面図であり、(c)は遮光部の拡大図である。

【図4】(a)は斜筒構造の遮光部を有するマスキング部材を示す斜視図であり、(b)は縦断面図であり、(c)は遮光部の拡大図である。

【図5】第1実施形態に係るマスキング部材の使用状態を示す縦断面図である。

【図6】(a)は第2実施形態に係るマスキング部材の全体斜視図であり、(b)は拡大図であり、(c)は遮光部周辺の拡大図であり、(d)は使用状態を示す縦断面図である。

【図7】(a)～(d)は第2実施形態に係るマスキング部材を用いた蛍光測定方法を示す説明図である。

【図8】(a)～(d)は第2実施形態に係るマスキング部材を用いた別の蛍光測定方法を示す説明図である。

【図9】(a)は第3実施形態に係る蛍光測定用キットを示す縦断面図であり、(b)は第4実施形態に係る蛍光測定用キットを示す縦断面図であり、(c)は第5実施形態に係る蛍光測定用キットを示す縦断面図である。

【図10】(a)～(e)は第5実施形態に係る蛍光測定用キットの使用方法を示す説明図である。

【図11】(a)は第6実施形態に係る蛍光測定用容器を示す斜視図であり、(b)は縦断面図であり、(c)は使用状態を示す縦断面図である。

【図 1 2】（a）は第 7 実施形態に係る蛍光測定用容器を示す全体斜視図であり、（b）は拡大図であり、（c）はウェル周辺の拡大図であり、（d）は使用状態を示す縦断面図である。

【符号の説明】

【0065】

1, 1 a, 1 b, 1 c … 遮光部

2, 2' … メッシュ

3, 3' … メッシュ穴

4 … 斜め穴

10, 20 … 外枠部

11 … リム状部

21 … シート状部

100, 100', 200 … マスキング部材

400 … 容器

500 … マイクロプレート

550 … ウェル

600, 700 … 蛍光測定用容器

630, 730 … 位置決め手段

750 … ウェル

800, 810, 820 … 蛍光測定用キット

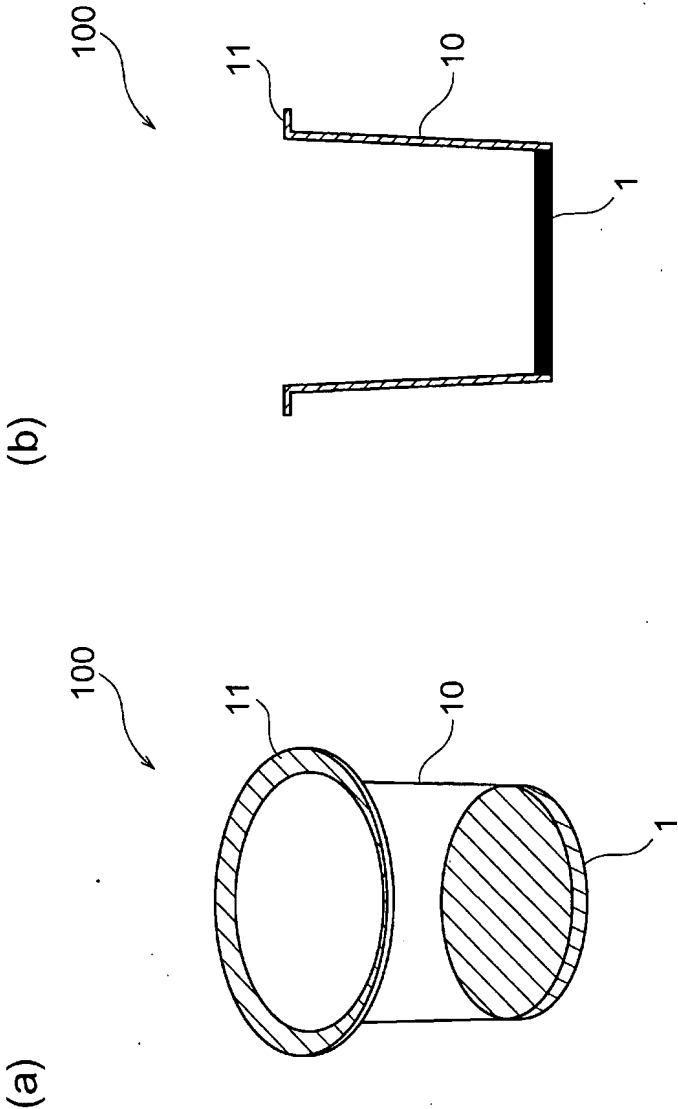
B … 蛍光色素を含む液（バッファー）

S … 測定対象物

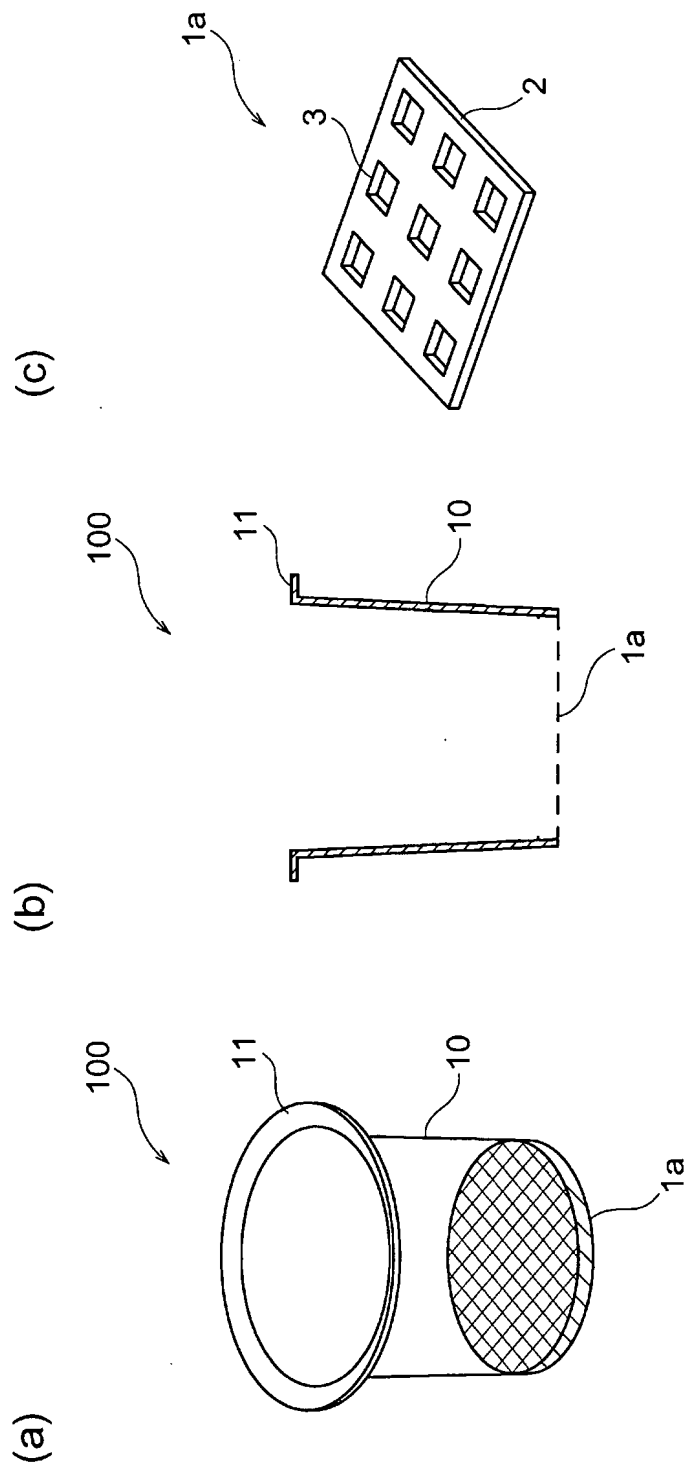
SS … サンプル溶液

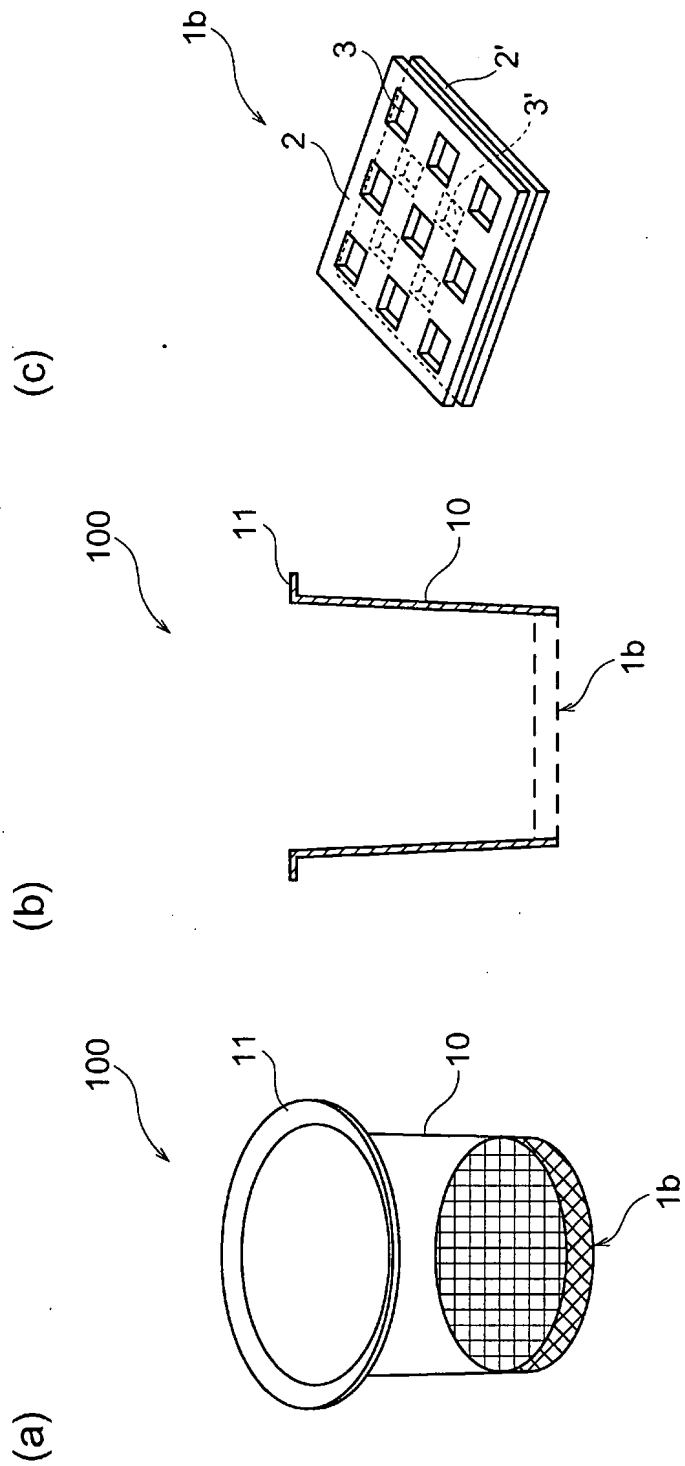
I … バッファーからの背景光

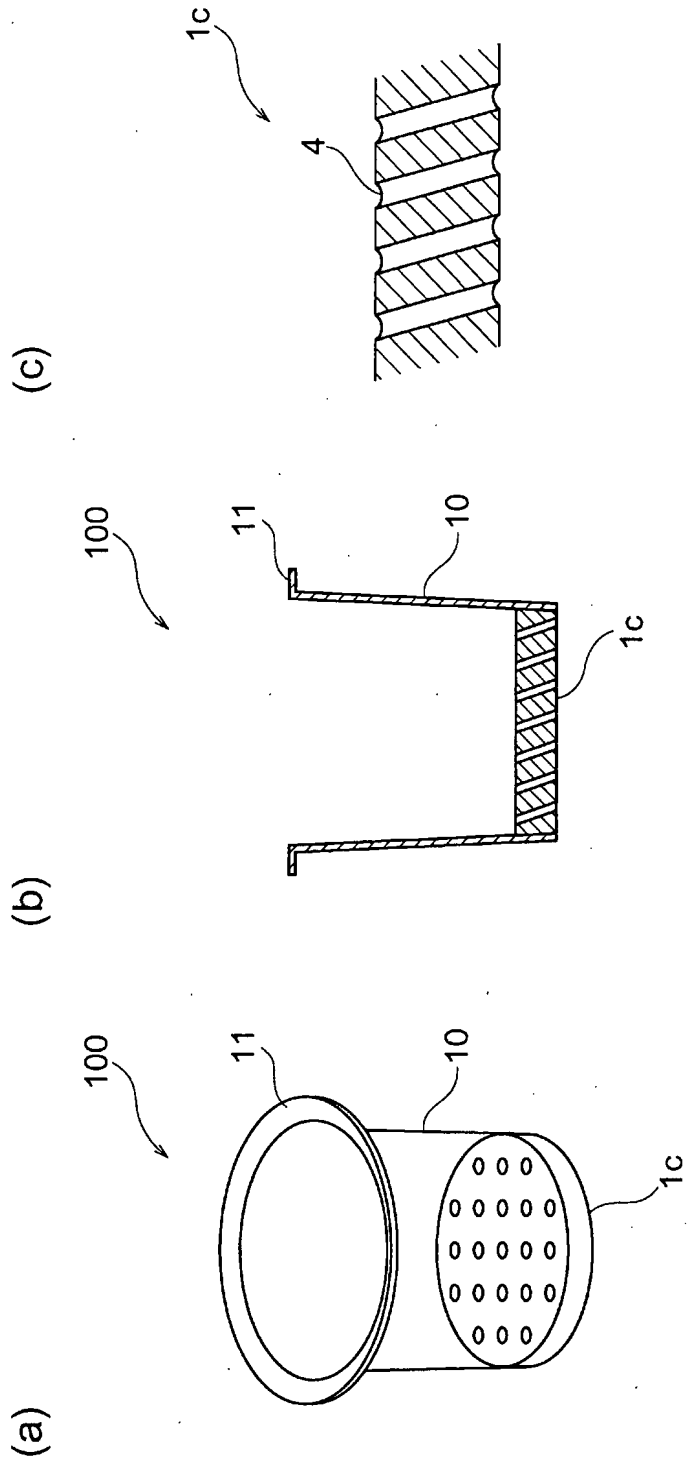
L … 測定対象物からの蛍光



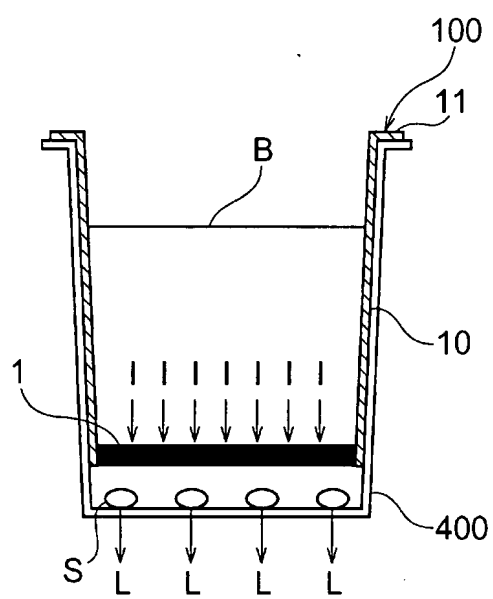
【图 2】

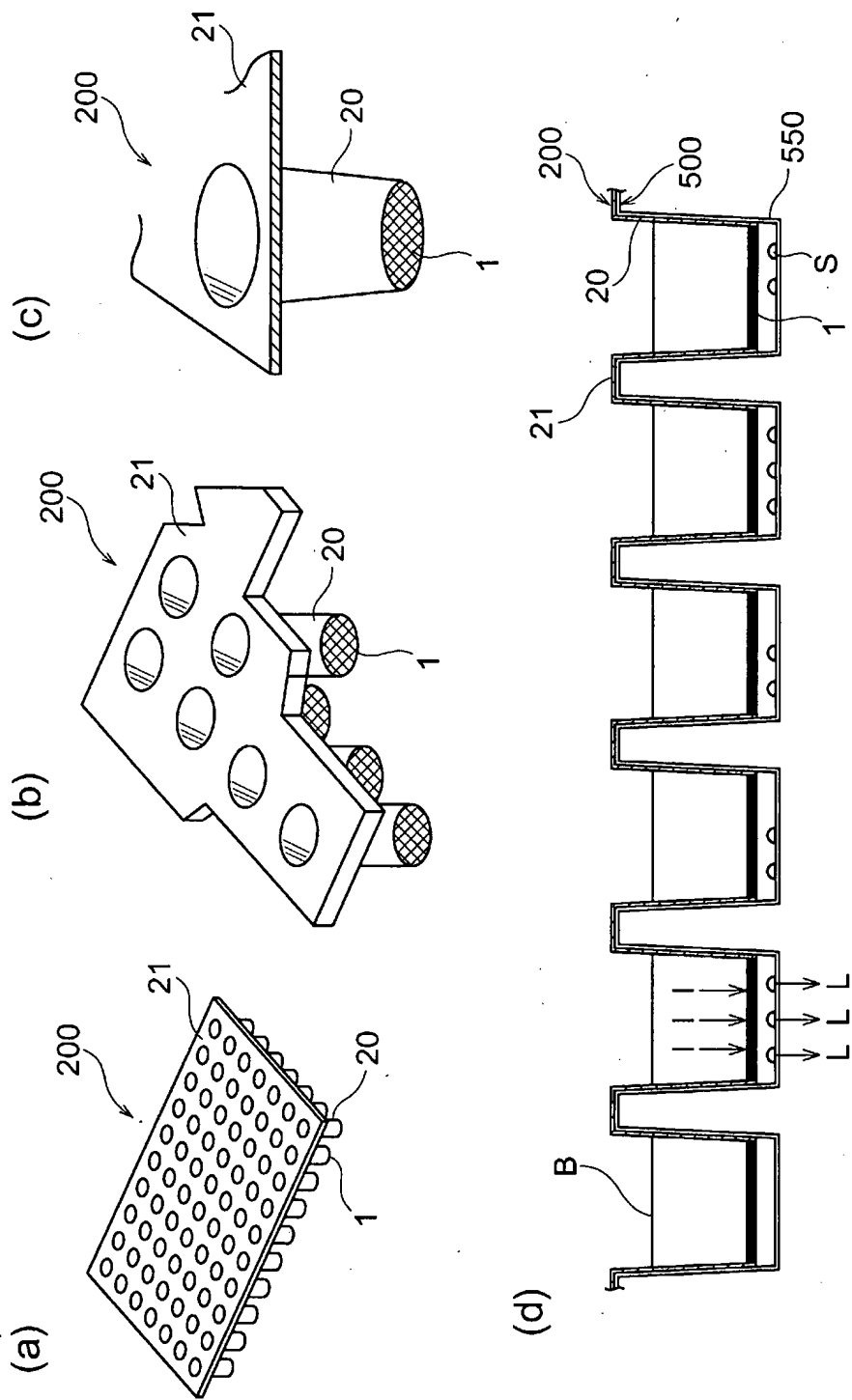




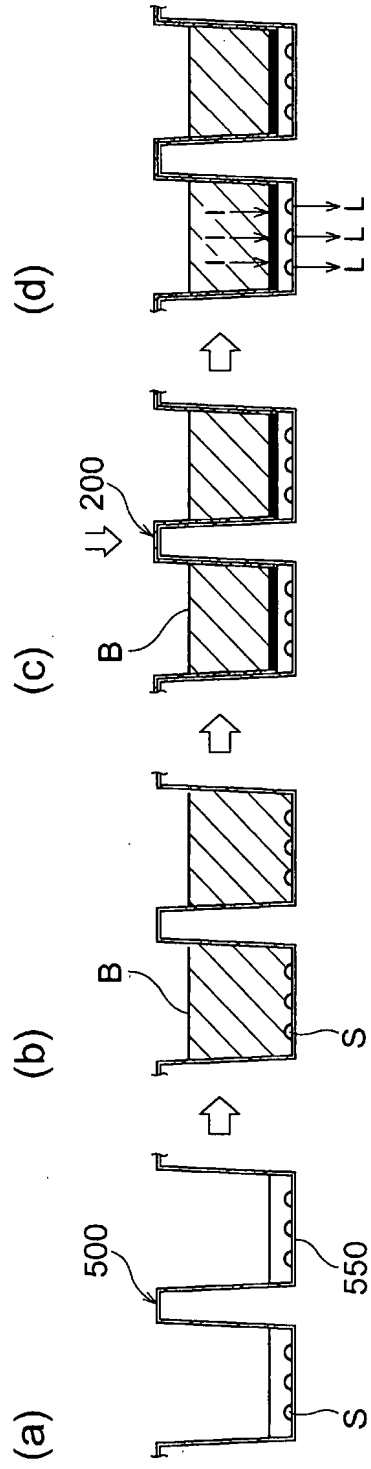


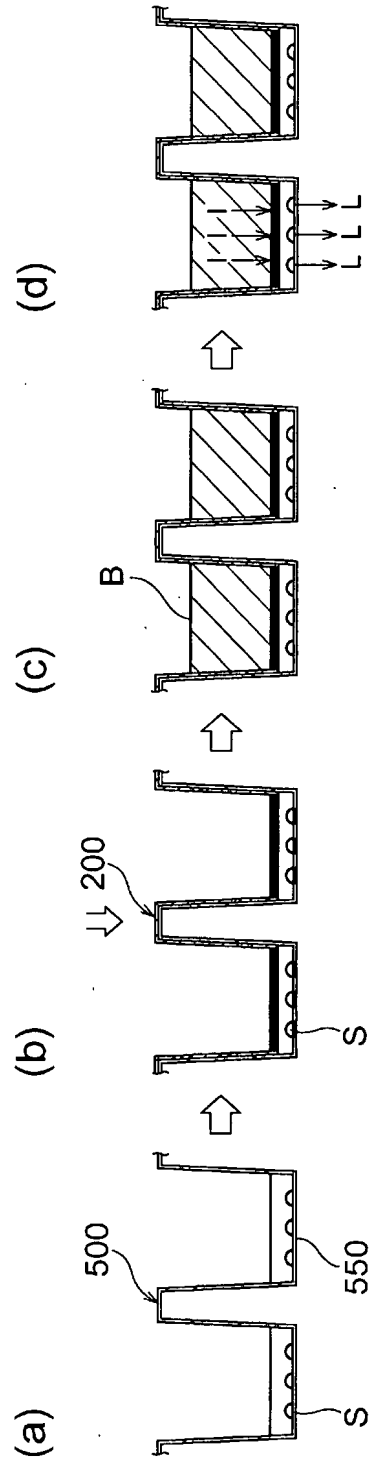
【図5】

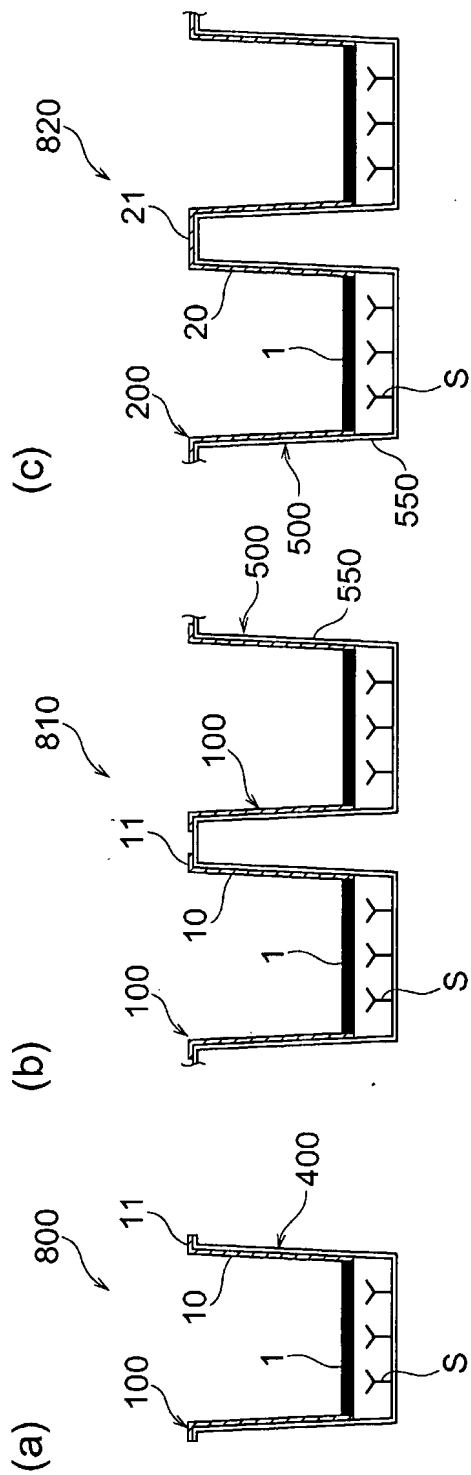


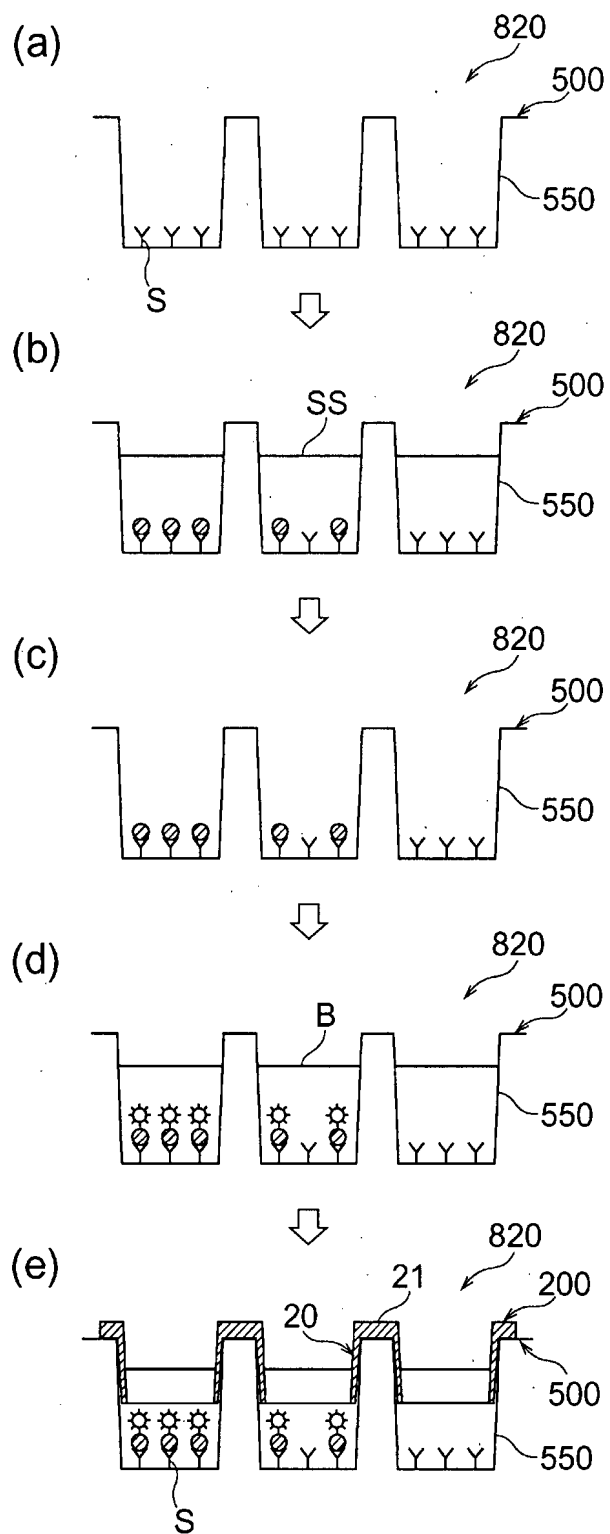


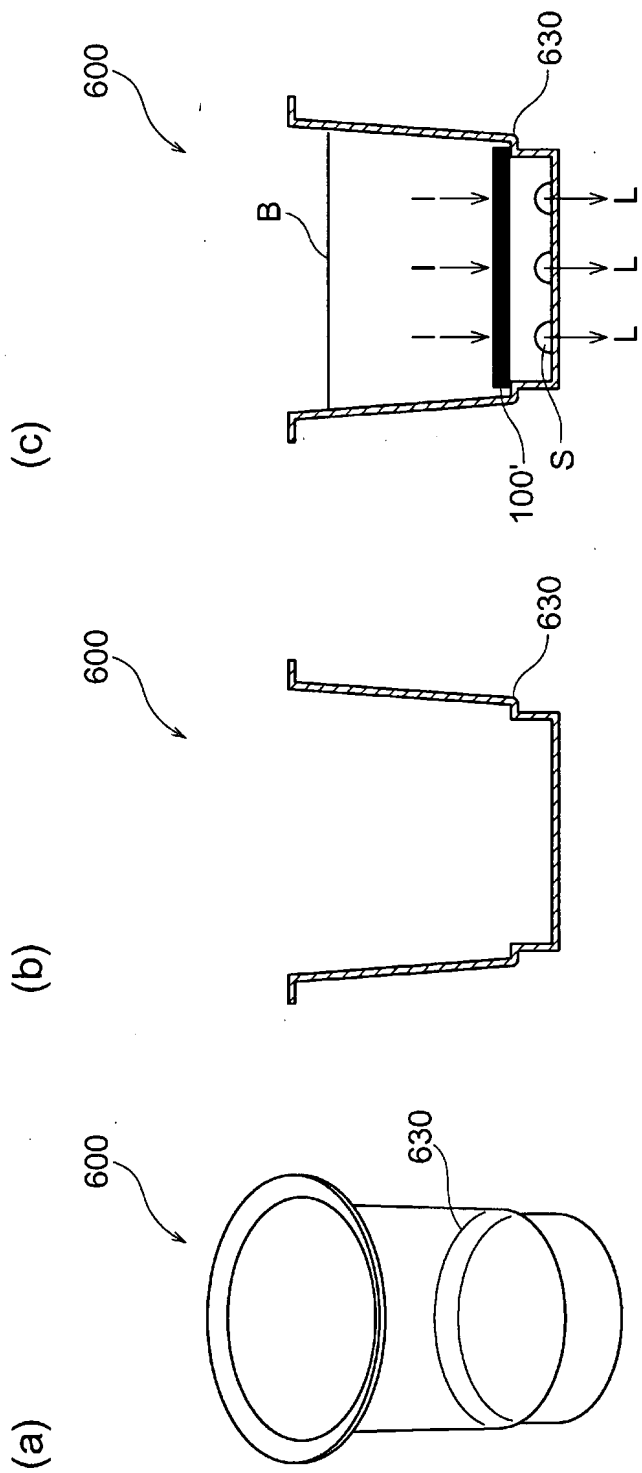
【図 7】

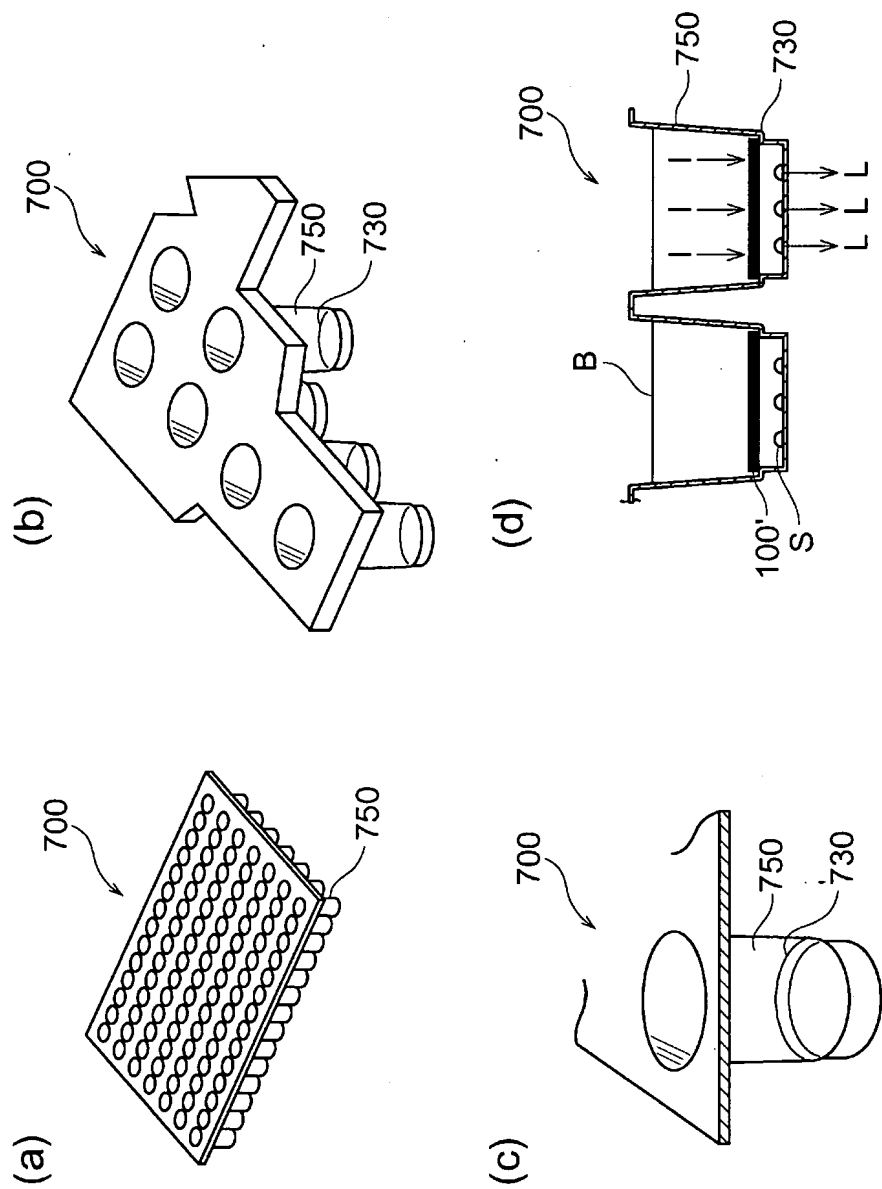












【書類名】要約書

【要約】

【課題】 バッファー中の化合物由来の蛍光による影響を測定対象物に悪影響を与えることなく確実に除去し、バッファーの蛍光色素の洗浄を不要とする。

【解決手段】 マイクロプレート500の複数のウェル550に入ったバッファーB中の測定対象物Sの蛍光状態をウェル550の底部から測定する際に使用されるマスキング部材200であり、複数のウェル550に対応した複数の遮光部1を備え、この遮光部1を支持する外枠部20も対応した複数の小円筒形状をなしている。遮光部1は遮光性および液体透過性を有し、測定対象物S上部のバッファーBからの背景光1を遮光して、測定対象物Sからの蛍光Lと分離する。外枠部20はマイクロプレート500の上面を覆うシート状部21を有し、マイクロプレート500の上面形状と嵌合してマイクロプレート500の各ウェル550内に各遮光部1をそれぞれ位置決めするようにされている。

【選択図】 図6

出願人履歴

0 0 0 2 3 6 4 3 6

19900810

新規登録

静岡県浜松市市野町 1 1 2 6 番地の 1

浜松ホトニクス株式会社